

Trabalho de Conclusão de Curso

EXPRESSÃO DE CÉLULAS HLA-DR POSITIVAS EM LESÕES METAPLÁSICAS, DISPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS DE COLO DE ÚTERO

Natália Cristina Trentin Bordignon



UFSC

**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Odontologia**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA**

Natália Cristina Trentin Bordignon

**EXPRESSÃO DE CÉLULAS HLA-DR POSITIVAS EM LESÕES
METAPLÁSICAS, DISPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS DE COLO
DE ÚTERO**

Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito para a conclusão do Curso de
Graduação em Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Rogério de
Oliveira Gondak
Co-orientadora: Dra. Ana Guadalupe
Gama Cuellar

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cristina Trentin Bordignon, Natália
Expressão de células HLA-DR positivas em lesões
metaplásicas, displásicas e neoplásicas de colo de
útero / Natália Cristina Trentin Bordignon ;
orientador, Rogério Gondak, coorientador, Ana
Guadalupe Gama Cuellar, 2017.
55 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências da Saúde, Graduação em Odontologia,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Patologia. 3. Cervix. 4.
Desenvolvimento neoplásico. I. Gondak, Rogério. II.
Guadalupe Gama Cuellar, Ana. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Odontologia.
IV. Título.

Natália Cristina Trentin Bodignon

EXPRESSÃO DE CÉLULAS HLA-DE POSITIVAS EM LESÕES
METAPLÁSICAS, DISPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS DE COLO DE
ÚTERO

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado, adequado para
obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final
pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa
Catarina.

Florianópolis, 20 de outubro de 2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rogério de Oliveira Gondak
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rodrigo Otávio Alves de Lima
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Mariana Comparotto Minamisako
Centro de Pesquisas Oncológicas

Dedico este trabalho à minha mãe, pelo amor e apoio emocional de todas as horas.

A todos os meus pacientes, que me deram a oportunidade de ser uma pessoa e profissional melhor. E, sobretudo, ao inocente sorriso que tocou profundamente meu coração, mas que voou nas do infinito.

AGRADECIMENTOS

Ao infinito amor que é Deus.

Aos meus amados pais que prepararam os meus caminhos.

Ao meu dedicado irmão, sempre presente e atencioso.

Aos meus professores e, em especial, ao Professor Rogério, que desde o início, com sua dedicação, me acolheu e soube com muita paciência me conduzir e me sustentar neste trajeto.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, me auxiliaram na elaboração dessa pesquisa e na minha formação.

“O corpo humano é talvez uma simples aparência, escondendo a nossa realidade, e condensando-se sobre a nossa luz ou sobre a nossa sombra. A realidade é a alma. A bem dizer, o rosto é uma máscara. O verdadeiro homem é o que está debaixo do homem. Mais de uma surpresa haveria se pudesse vê-lo agachado e escondido debaixo da ilusão que se chama carne. O erro comum é ver no ente exterior um ente real.”

Victor Hugo, 1866

RESUMO

A resposta imune local no colo uterino é assegurada pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), incluindo as células dendríticas (CDs), derivadas de precursores mielóides e linfóides, que modulam a resposta imune inata e adquirida, exercendo papel fundamental na imunidade antitumoral. Alterações citológicas e histológicas podem afetar a morfologia das células imunocompetentes, bem como sua função, maturação e sobrevivência. Avaliamos quantitativamente a população de APCs em amostras de biópsias e peças cirúrgicas de colo de útero oriundas de sete grupos distintos de pacientes: portadoras de diagnóstico de cervicite com metaplasia (Grupo 1, n=10), lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) em colo de útero (Grupo 2, n=7), portadoras de lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) em colo de útero (Grupo 3, n=14), carcinomas bem diferenciados em colo de útero (Grupo 4, n=6), carcinomas moderadamente diferenciados em colo de útero (Grupo 5, n=12), carcinomas pouco diferenciados em colo de útero (Grupo 6, n=8) e adenocarcinomas (Grupo 7, n=5). Reações imuno-histoquímicas com anticorpo HLA-DR foram aplicadas para identificação das APCs. Os marcadores imuno-histoquímicos foram quantificados com o auxílio do software Image J 1.45s em alta magnificação (400x). Houve uma diminuição de células HLA-DR+ nos grupos com lesões neoplásicas mais agressivas (grupos 6 e 7). Uma correlação positiva das células HLA-DR+ epiteliais e conjuntivas foi evidenciada em todos os grupos ($r = +0,499$; $P < 0,001$). Assim, pode-se concluir que o desenvolvimento ou agressividade tumoral em colo de útero pode ser influenciado pela população de APCs locais.

Palavras-chave: colo do útero, carcinoma, adenocarcinoma, células dendríticas, imuno-histoquímica.

ABSTRACT

The immune local response in uterine cervix is mediated by antigens presenting cells (APCs). Among the APCs, the dendritic cells (DCs), derived from myeloid and lymphoid precursors are a link for modulation of innate and acquired immune responses, having a key role in antitumor immunity. However, it's known that cytological and histological changes may affect the morphology of immunocompetent cells, as well as their function, maturation and survival. In our study we quantitatively evaluated the APCs population in samples of biopsy or specimens from uterine cervix of 7 different patients groups: patients with cervicitis and metaplasia diagnosis (Group 1, n=10); low-grade squamous intraepithelial lesion in uterine cervix (Group 2, n=7); patients with high-grade squamous intraepithelial lesion in uterine cervix (Group 3, n=14); well differentiated carcinoma in uterine cervix (Group 4, n=6), moderately differentiated carcinoma in uterine cervix (Group 5, n=12); poorly differentiated carcinoma in uterine cervix (Group 6; n=8) and adenocarcinoma (Group 7, n=5). Immunohistochemical reactions with HLA-DR antibody were performed for identification of these cells. The immunostaining cells were quantified using the software Image J 1.45s at high magnification (400x). There was a decrease of HLA-DR + cells in the groups with more aggressive neoplastic lesions (groups 6 and 7). A positive correlation of epithelial and connective HLA-DR + cells was observed in all groups ($r = +0.499$; $P < 0.001$). Thus, it can be affirmed that cervical tumor development or aggressiveness can be influenced by the population of local APCs.

Keywords: uterine cervix, carcinoma, adenocarcinoma, dendritic cells, immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Quantificação de células HLA-DR+ epiteliais em cada grupo.....	36
Figura 2 – Quantificação de células HLA-DR+ conjuntivas em cada grupo.....	37
Figura 3 - Expressão imuno-histoquímica de células HLA-DR+ em tecido epitelial e conjuntivo de amostras de colo de útero com metaplasia, lesão intraepitelial escamosa de alto grau e lesão intraepitelial escamosa de baixo grau	38
Figura 4 - Imunoexpressão de células HLA-DR+ em amostra de colo de útero com carcinoma epidermóide bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado e adenocarcinoma.....	38
Figura 5 – Correlação positiva na quantificação de células HLA-DR + presentes no epitélio e tecido conjuntivo dos grupos estudados.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Quantidade total e relativa dos 31 pacientes pertencentes aos grupos 4, 5, 6 e 7 quanto ao Estadiamento clínico	34
Tabela 2 – Quantidade total e relativa de pacientes pertencentes aos grupos 4, 5, 6 e 7 quanto ao tipo de tratamento realizado	35
Tabela 3 - Média e desvio padrão de idade, tempo de evolução da lesão e quantidade de células HLA-DR+ em epitélio e conjuntivo em cada grupo estudado.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC - Célula apresentadora de antígeno

CAEE - Certificado de apresentação para apreciação ética

CD - Célula dendrítica

CE - Carcinoma epidermóide

CL - Célula de Langerhans

DP - Desvio padrão

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HPV - Vírus do papiloma humano

HSIL- Lesão intraepitelial escamosa de alto grau

HU - Hospital Universitário

LPB - Laboratório de Patologia Bucal

LSIL- Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau

SAP - Serviço de Anatomia Patológica

SIL- Lesão intraepitelial escamosa

PH - Potencial hidrogeniônico

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE SÍMBOLOS

\pm - Mais ou menos

μ - micrômetro

$<$ - Menor

$>$ - Maior

L - Litro

M – Mol (Concentração; molaridade)

mm^2 - milímetro quadrado

r - correlação

P – significância estatística

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3. METODOLOGIA	31
3.1 Aspectos Éticos	31
3.2 Delineamento	31
3.3 Hipótese	31
3.4 Coleta do Material	31
3.5 Reações imuno-histoquímicas	32
3.6 Avaliação da imunorreatividade	33
3.7 Análise Estatística	33
4. RESULTADOS	34
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
APÊNDICE A	51
ANEXO A	55

1. INTRODUÇÃO

As células imunocompetentes do colo uterino abrangem um vasto número de tipos celulares, como as células dendríticas (CDs) que são caracterizadas como células apresentadoras de antígenos (APCs) e responsáveis pela indução de resposta imune antitumoral (PIRTSKHALAISHVIL et al., 2000; GARG et al., 2013; LUZARDO-BAPTISTA et al., 2013). As CDs formam a primeira barreira de defesa contra indutores patogênicos e constituem uma família de células capazes de interagir com os linfócitos T e B e modular as suas respostas (KELLER, 2001; PEREZ et al., 2005; KOSTEN et al., 2017).

Embora as CDs sejam fundamentais contribuintes para sediarem a imunidade e vigilância imunológica contra tumores, as células malignas podem desenvolver mecanismos que inibam a atividade das CDs, a fim de evadirem o reconhecimento imunológico. Algumas pesquisas têm demonstrado que diferentes tumores podem interferir na geração, maturação, função e sobrevivência das CDs (OYAMA et al., 1998; PIRTSKHALAISHVILI et al., 2000; SHURIN et al., 2002). Estes estudos demonstram que os tumores de crescimento rápido são geralmente pobremente infiltrados por CDs e incapazes de desencadear o recrutamento e ativação das CDs, resultando em respostas imunes antitumorais insuficientes. Entretanto, os mecanismos que regulam a migração das CDs para o interior dos tumores ainda não são bem compreendidos.

O câncer de colo de útero é uma doença crônica que pode ocorrer a partir de mudanças epiteliais surgidas a partir de lesões pré-neoplásicas denominadas lesões intraepiteliais escamosas cervicais (SIL) (TAMIOLOAKIS et al., 2003). Estas lesões podem ser induzidas por infecções virais como papiloma vírus humano (HPV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), e por fatores de risco como tabagismo, uso prolongado de anticoncepcionais e multiparidade (IARC, 1995; WALBOOMERS et al., 1999; BOSCH et al., 2002; FERENCZY e FRANCO, 2002). Estas lesões tem diferentes gradações citológicas e histológicas, compreendendo as lesões de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL) (AMBROS; KURMAN, 1990; CRUM, 2003). As alterações nos processos de divisão celular, relação núcleo citoplasma, tamanho das células e grau de desorganização das camadas epiteliais são alguns dos parâmetros empregados para determinar a gravidade da lesão.

A maioria das lesões intraepiteliais escamosas cervicais está associada com uma densidade mais baixa e/ou alteração funcional das

células de Langerhans (CLs), que constituem uma subpopulação de CDs imaturas presentes no epitélio da mucosa escamosa (AH-SALEH et al., 1998; GIANNINI et al., 2002). Li et al (2014) comparando a atividade imune de colo uterino normal e colo com lesões intraepiteliais escamosas cervicais e neoplásicas, constataram que o número de células imunocompetentes CDs S-100+, TCD4+ e células CD57+NK aumentou de acordo com a progressão das lesões intraepiteliais escamosas cervicais e diminuiu em lesões neoplásicas. Isso indica haver uma mudança na expressão imune local, já que houve diminuição na quantidade e intensidade da expressão das células imunocompetentes com o aumento da gravidade das lesões.

O carcinoma invasor de células escamosas do colo do útero ou cérvix é ainda o tumor maligno mais comum do trato genital feminino na maioria dos países e a terceira neoplasia mais frequente entre as mulheres no Brasil, atrás de câncer de mama e do colorretal, sendo a quarta causa de morte de mulheres com câncer (PIVER, 1990; CANNISTRA e NILOFF, 1996; IARC, 1992; INCA, 2016)

Estudos imuno-histoquímicos de tumores infiltrados por CDs revelaram que o aumento do número de CDs intratumorais apresentou melhores prognósticos em adenocarcinomas colorretais (AMBE; MORI; ENJOJI, 1989), carcinomas gástricos, esofágicos e nasofaríngeos (NOMORI et al., 1986; TSUJITANI et al., 1990; IMAI e YAMAKAWA, 1993). Para Zhang (1992) e Ma et al (1995), uma maior densidade de CLs em tecido tumoral sugere melhor prognóstico e tempo de sobrevida em pacientes com carcinoma de laringe. Pacientes com maiores níveis de tumores associados às CDs demonstraram maior sobrevida e menores índices de metástases (BECKER, 1992; 1993). Assim, a quantificação da CDs no tecido tumoral poderia ser considerada como um marcador de grau tumoral, tais como agressividade e progressão.

Alguns estudos indicam uma diminuição na densidade de CLs em carcinomas basocelulares quando comparada com a epiderme perilesional normal (BERGFELT, LARKO e LINDBERG, 1992; BERGFELT et al., 1994; SCHREINER, LISCHKA e SCHAUMBURG-LEVER, 1995).

Mardones et al (2009) quantificaram as CDs CD1a+ na epiderme peritumoral de 12 casos de carcinomas basocelulares e observaram evidente diminuição na contagem das CDs em áreas tumorais e alterações morfológicas das CDs como diminuição e

irregularidade dos prolongamentos dendríticos. Estes achados poderiam ser indicadores de disfunção das CDs provocada pelas células tumorais.

Analisando sítios frequentemente afetados por carcinoma epidermóide em mucosa bucal, Duray et al (2010) observaram aumentado número de CDs CD1a+ e de CDs HLA-DR+ no lábio de pacientes tabagistas. CDs S100+ dentro e ao redor de tumores malignos também foi estudado por Ambe, Mori e Enjoji (1989) em 121 pacientes com adenocarcinoma colorretal. A taxa de sobrevida em 5 anos foi de 70,5% em pacientes com alto índice de CDs S100+ e 33,3% em pacientes com poucas células S100+.

CLs S-100+ foram analisados por Zhang (1992) por meio de reação imuno-histoquímica em 25 casos de estágio II e 50 casos de estágio III de carcinoma de laringe. Houve melhor prognóstico e taxa de sobrevida em pacientes com maior infiltrado de CLs no tecido tumoral.

Perez et al (2005) avaliaram pulmão humano normal (5 casos), hiperplasias epiteliais orais (5 casos), CE (carcinoma epidermóide) oral (5 casos) e adenocarcinomas de próstata (20 casos) por meio de um painel imuno-histoquímico para CDs que incluiu CD83, CD1a, CD11c e S-100. Os resultados mostraram que as hiperplasias orais foram altamente infiltradas por S-100 e CD1a e, em menor expressão para CD11c e CD83. CD11c foi positivo em pulmão humano e alguns casos de adenocarcinomas de próstata e, principalmente ausente em tecidos com CEs orais. Adenocarcinomas de próstata e CEs orais expressaram S-100 e CD1a em menor grau e não expressaram positividade para CD83.

Plzáková et al (2004) compararam a expressão de langerina e receptor de manose (RM) 175 kD em células dendríticas de cinco amostras de pele normal e doze amostras de carcinomas de células basais (CCBs). Uma baixa incidência de CLs langerina positiva foi observada em CCBs quando comparadas à epiderme normal e um terço dos tumores estudados apresentaram elementos de langerina positiva fora do epitélio tumoral. Estas células estavam situadas nas proximidades das células que expressaram RM.

Embora a Literatura apresente alguns estudos científicos sobre a participação das APCs, especialmente as CDs, em lesões neoplásicas em diferentes regiões anatômicas, a análise desta população de APCs em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas em colo uterino é escassa.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal:

O objetivo principal deste estudo foi identificar e quantificar a população de células HLA-DR+ em sete grupos distintos de pacientes: pacientes portadoras de diagnóstico de cervicite com metaplasia (Grupo 1), lesão intraepitelial escamosa de baixo grau em colo de útero (LSIL)(Grupo 2), lesão intraepitelial escamosa de alto grau em colo de útero (HSIL)(Grupo 3), carcinomas bem diferenciados em colo de útero (Grupo 4), carcinomas moderadamente diferenciados em colo de útero (Grupo 5), carcinomas pouco diferenciados em colo de útero (Grupo 6) e adenocarcinomas (Grupo 7).

2.2 Objetivos específicos:

a) Selecionar as lesões metaplásicas, displásicas e neoplásicas de acordo com os critérios da OMS;

b) Identificar e quantificar, por meio de reações imuno-histoquímicas, as células imunomarcadas pelo anticorpo anti-HLA-DR em lesões metaplásicas, displásicas e neoplásicas de colo de útero;

c) Comparar o número médio de células imunomarcadas em áreas epiteliais e conjuntivas nos grupos afetados;

d) Correlacionar os achados clínicos dos pacientes como idade, etnia, uso crônico de medicamentos, doenças de base, tabagismo e etilismo com os achados microscópicos.

3. METODOLOGIA

3.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (Apêndice A) em acordo com o Conselho Nacional de Saúde (Ministério da Saúde, Brasil) para pesquisa em assuntos humanos (CAAE 56663316.0.0000.0121).

3.2 Delineamento

Estudo descritivo observacional, tipo caso-controle.

3.3 Hipótese

Como hipótese do estudo estabeleceu-se: lesões pré-neoplásicas (displásicas e metaplásicas) de alto grau e tumores de colo de útero mais agressivos ou indiferenciados apresentam menor quantificação de células HLA-DR+ quando comparadas respectivamente com lesões pré-neoplásicas de baixo grau ou tumores bem diferenciados em colo de útero.

3.4 Coleta de Material

Este estudo, de caráter retrospectivo, foi constituído por 7 grupos e contou com a contribuição de amostras teciduais de colo de útero emblocadas em parafina oriundas de biópsias ou peças cirúrgicas provenientes do Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital Universitário da UFSC.

Os grupos de pesquisa foram formados por 10 amostras de biópsias de colo de útero ou histerectomia com diagnóstico de cervicite com metaplasia (Grupo 1), 7 amostras com diagnóstico de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL)(Grupo 2), 14 amostras com lesão intraepitelial escamosa de alto grau(HSIL)(Grupo 3), 6 amostras de carcinomas bem diferenciados em colo de útero (Grupo 4), 12 amostras de carcinomas moderadamente diferenciados (Grupo 5), 8 amostras de carcinomas pouco diferenciados (Grupo 6) e 5 amostras de adenocarcinomas (Grupo 7).

Para a seleção dos indivíduos participantes da pesquisa, foram incluídas amostras teciduais de colo de útero de mulheres com idade mínima de 18 anos. O estudo excluiu pacientes portadores de doenças

autoimunes ou neoplasias que não fossem carcinomas ou adenocarcinomas em colo de útero.

Informações clínicas incluindo idade, gênero, etnia, tempo de queixa, sinais, sintomas, tratamento efetuado, recorrência e situação clínica na última avaliação foram obtidas a partir das fichas de biopsias/peças cirúrgicas e dos prontuários médicos.

As análises das lâminas coradas em hematoxilina & eosina (H&E) foram realizadas por dois patologistas experientes (RG, DV) objetivando classificar as lesões displásicas em alto ou baixo grau (CRUM, 2003) e determinar o grau de diferenciação dos tumores de acordo com os critérios da OMS (WHO, 2014). As amostras que não permitiram a classificação histopatológica ou que impossibilitaram a execução de todas as etapas referentes à preparação histológica e à técnica de imuno-histoquímica foram excluídas do trabalho.

3.5 Reações Imuno-histoquímicas

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB-UFSC) para a identificação das células HLA-DR+ em tecido epitelial e conjuntivo.

Foi obtido uma secção tecidual de 3µm de espessura dos blocos de parafina das amostras selecionadas e montagem em lâminas silanizadas. Em seguida foi realizada desparafinização colocando as lâminas na estufa a 50-100°C por aproximadamente três horas. Após, foi realizado um banho overnight em xilol a temperatura ambiente. A próxima etapa consistiu na reidratação dos cortes em xilol, etanol absoluto, etanol a 95%, etanol a 85% e lavagens em água corrente e destilada. O bloqueio da peroxidase endógena ocorreu em água oxigenada (10 volumes) com álcool metílico e tampão PBS, e após, banhos em tampão PBS e água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada por meio de solução de tampão citrato 0,01M, PH 6,0 diluído em água destilada e aquecido em banho maria durante 40 minutos em temperatura constante de 96°C. Após o processo, as lâminas esfriaram por cerca de 30 minutos. Posteriormente, realizamos o bloqueio das ligações inespecíficas por 40 minutos em solução de leite desnatado e PBS. Depois, houve incubação do anticorpo primário, que permaneceu em contato com os cortes por 24 horas.

No dia seguinte, os cortes receberam dois banhos de cinco minutos de tampão PBS. A seguir, os cortes foram incubados com

anticorpos secundários *Envision* durante uma hora, seguido de dois banhos de cinco minutos de tampão PBS. Após isso, cada corte foi corado com 50 a 70 μ L de solução cromógena (DAB, Dako) associada a solução tampão durante quatro minutos. Esse processo foi realizado sem luminárias auxiliares, pois o cromógeno é sensível à luz. Em seguida, os cortes levaram um banho de cinco minutos de água destilada. Após, os cortes foram contra corados com Hematoxilina de Carazzi de dois a cinco minutos. Depois, foram lavados em água corrente até desaparecimento da coloração azulada na água. A remoção do pigmento formólico foi realizada em três rápidas imersões de um segundo cada, em solução aquosa de hidróxido de amônia a 1%. Lavou-se imediatamente em água corrente durante no mínimo dois minutos.

A próxima etapa consistiu na desidratação em álcool etílico 85%, álcool 95% e álcool absoluto. Após esse processo, realizou-se dois banhos de vinte minutos de xilol e montagem das lâminulas com resina *Entellan*.

3.6 Avaliação da Imunorreatividade

A quantificação das células com positividade para o anticorpo HLA-DR foi realizada utilizando-se microscópio óptico (Carl Zeiss) com objetiva de 40x e ocular de 10x (Reichert, Áustria) associado a câmera fotográfica Nikon PowerShot para captura de 5 campos sequenciados de tecido epitelial e conjuntivo totalizando uma área de 1mm² de análise. A escolha da região foi determinada pela integridade estrutural do tecido e positividade mais evidente (*hotspot*). As células positivas foram contadas nas áreas metaplásicas, displásicas e neoplásicas com o auxílio do software Image J 1.45s. Os resultados foram expressos em células positivas por epitélio e conjuntivo das lesões metaplásicas, displásicas e tumorais. Após a determinação do número médio de células HLA-DR+/mm² tecidual, os diferentes grupos foram comparados estatisticamente.

3.7 Análise Estatística

Para as análises comparativas das células imunomarcadas entre os grupos foram aplicados os testes paramétricos ANOVA e testes de correção Bonferroni. Também foram aplicados testes de correlação de Spearman para comparação entre as células HLA-DR+ no tecido epitelial e conjuntivo com o auxílio do software SPSS versão 18.0. Os

resultados foram expressos como média ± DP e o nível de significância estatística considerado foi de 5% ($P < 0.05$).

4. RESULTADOS

Os 62 casos analisados em nosso estudo foram separados em sete grupos distintos, de acordo com a lesão que apresentavam no colo uterino. Do total dos casos, cuja média de idade foi de $44,7 \pm 12,2$ anos, 24 pacientes (36,9%) eram tabagistas e apenas uma paciente (0,65%) fazia uso crônico de álcool. Além disso, 80% das pacientes eram leucodermas, 9,1% faziam uso de anticoncepcionais ou tiveram contato com a terapia hormonal em algum período da vida. Dentre as doenças de base mais comuns, quatro pacientes (6,4%) eram portadoras do vírus HIV e a hipertensão arterial sistêmica foi a mais prevalente, estando presente em 18% dos casos. Do total de pacientes estudados, 11 tiveram recorrência da lesão pré-maligna (metaplásica ou displásica) e 1 teve recorrência da lesão neoplásica pós-tratamento.

Dados adicionais relacionados às pacientes portadoras de doenças neoplásicas (grupos 4 a 7) podem ser visualizados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Quantidade total e relativa dos 31 pacientes pertencentes aos grupos 4, 5, 6 e 7 quanto ao Estadiamento clínico.

Estadiamento				
	I	II	III	<i>Dados faltantes</i>
Pacientes	9	4	5	13
(%)	(50%)	(22%)	(28%)	

Tabela 2: Quantidade total e relativa de pacientes pertencentes aos grupos 4, 5, 6 e 7 quanto ao tipo de tratamento realizado.

Modalidade de Tratamento					
	Cirurgia	Radioterapia	Quimioterapia	Terapias Combinadas	<i>Dados faltantes</i>
Pacientes	11	1	0	12	07
(%)	(45,8%)	(4,2%)	(0 %)	(50%)	

Com relação à análise quantitativa de células HLA-DR+ nos tecidos epitelial e conjuntivo, a densidade de células de apresentadoras de antígenos nesses tecidos foi substancialmente reduzida nos grupos 6 (carcinoma pouco diferenciado) e 7 (adenocarcinoma) conforme evidenciados na Tabela 3 e Figuras 1-4. Embora com diferença menos significativa em relação aos demais grupos, as células HLA-DR+ epiteliais e conjuntivas se mostraram em menor número também no grupo 4 (carcinoma bem diferenciado). No entanto, não foi encontrada significância estatística nessas comparações ($P > 0,05$). Também não houve correlação direta entre os fatores clínicos levantados como doenças de base, alcoolismo, tabagismo e terapias hormonais com a quantificação de células HLA-DR+ ($P > 0,05$).

Tabela 3. Média e desvio padrão de idade, tempo de evolução da lesão e quantidade de células HLA-DR+ em epitélio e conjuntivo em cada grupo estudado.

Grupo	Idade	Tempo de evolução (meses)	Células HLA-DR+ (Epitélio)	Células HLA-DR+ (Conjuntivo)
Metaplasia	46 ± 13,6	51,50 ± 71,11	109,7 ± 82,6	282,0 ± 120,5
LSIL	37,8 ± 14,7	6 ± 0	447,6 ± 212,3	311,1 ± 144,7
HSIL	38,7 ± 9	48 ± 0	323,3 ± 230,5	254,9 ± 157,9
CE bem diferenciado	44,1 ± 7,1	3,8 ± 4,3	63,4 ± 66,8	57,1 ± 88,2
CE moderadamente diferenciado	52 ± 13,3	9,6 ± 3,2	324,8 ± 403,7	437 ± 335,5

CE pouco diferenciado	49,8 ± 13,6	9,2 ± 10,1	0 ± 0	0 ± 0
Adenocarcinoma	50,2 ± 7,2	36 ± 0	141,2 ± 282,3	127,6 ± 268,2

LSIL: lesão intraepitelial escamosa cervical de baixo grau; HSIL: Lesão intraepitelial escamosa cervical de alto grau; CE: Carcinoma epidermóide

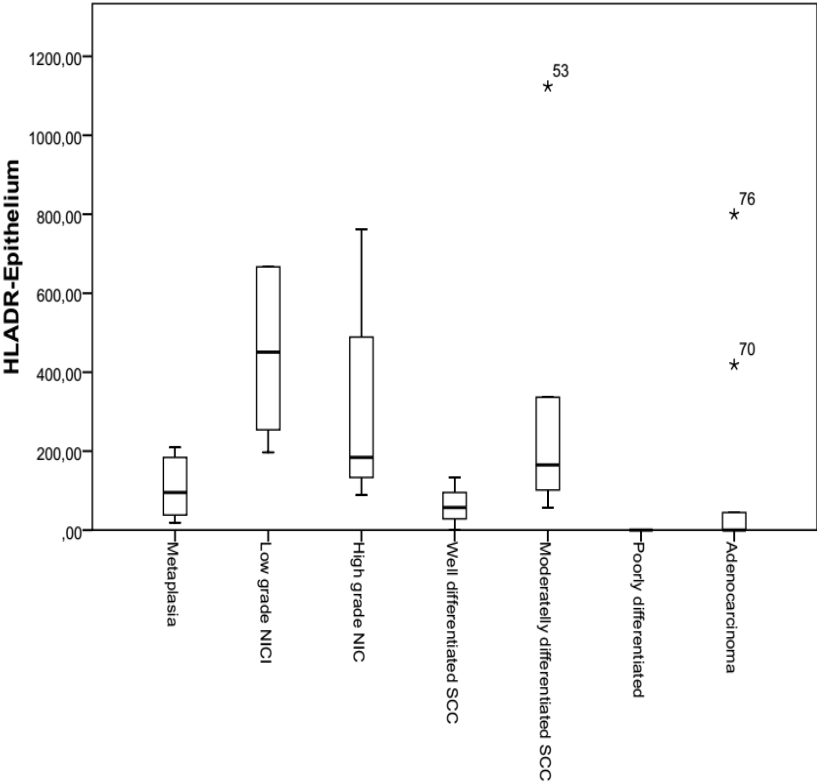


Figura 1: Quantificação das células HLADR+ epiteliais em cada grupo estudado. * Outliers

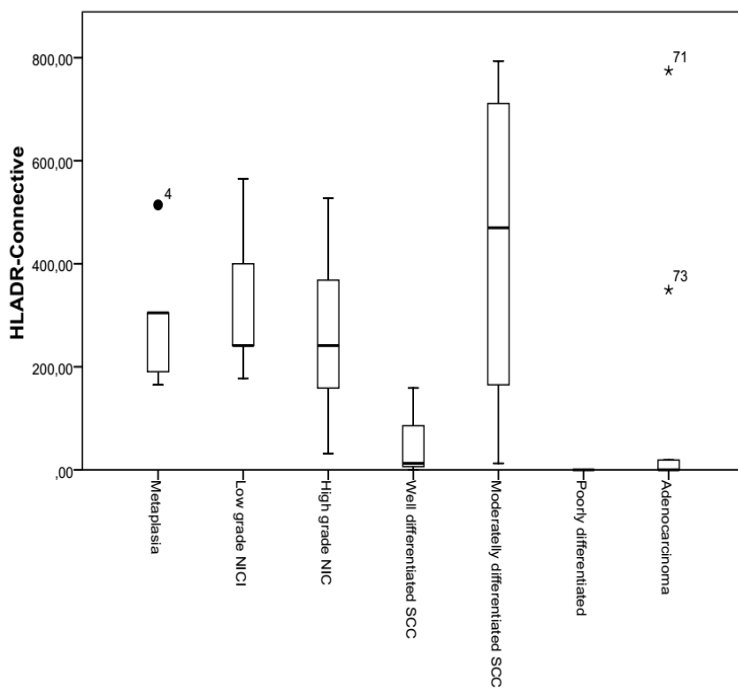


Figura 2: Quantificação das células HLADR+ conjuntivas em cada grupo estudado. •.*Outliers

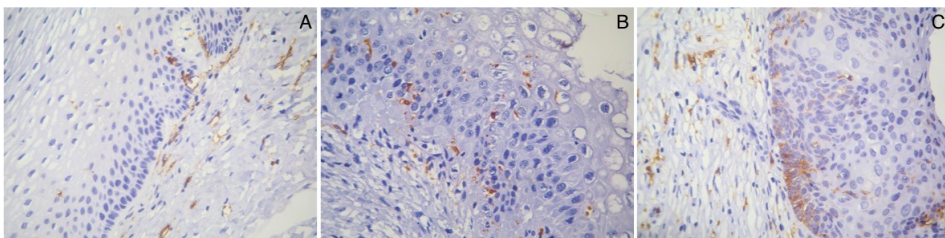


Figura 3. Expressão imuno-histoquímica de células HLA-DR+ em tecido epitelial e conjuntivo de amostras de colo de útero com metaplasia (A), lesão intraepitelial de baixo grau (B) e lesão intraepitelial de alto grau (C). Magnificação, 400x.

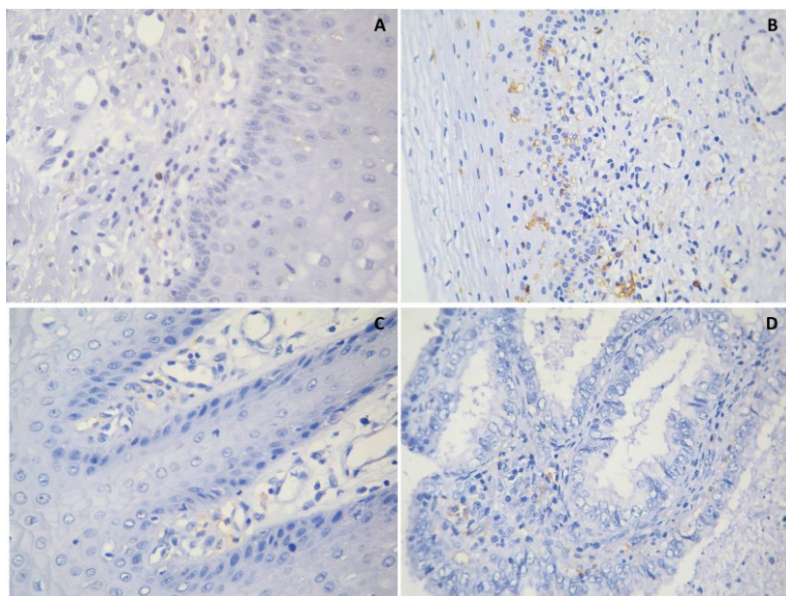


Figura 4. Imunoexpressão de células HLA-DR+ em amostra de colo de útero com carcinoma de células escamosas bem diferenciado (A), moderadamente diferenciado (B), pouco diferenciado (C) e adenocarcinoma (D). Magnificação, 400x.

Houve, contudo, uma correlação positiva na quantificação de células HLADR+ positivas no tecido epitelial e conjuntivo (Figura 5) em todos os grupos estudados ($r = +0,499$; $P < 0,001$).

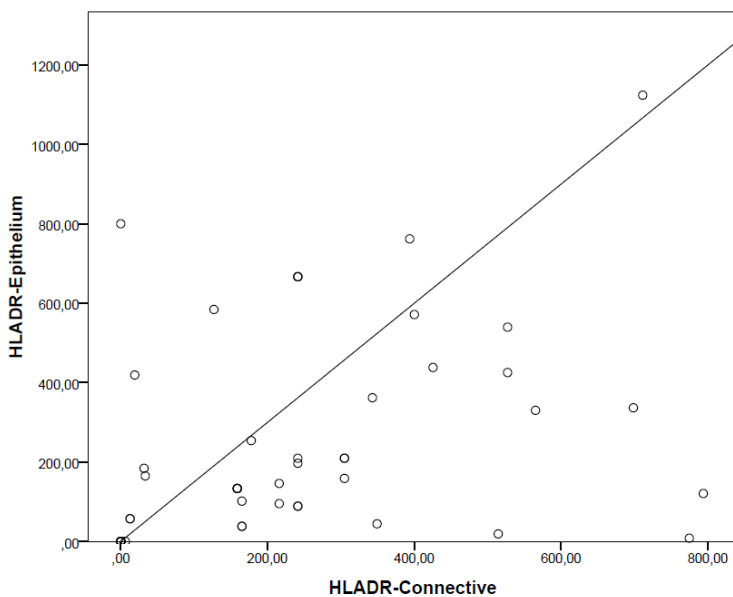


Figura 5: Correlação positiva na quantificação de células HLA -DR + presentes no epitélio e tecido conjuntivo dos grupos estudados.

5. Discussão

O presente estudo revelou que as células apresentadoras de antígenos (APCs) podem ter uma participação no desenvolvimento e evolução de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas em colo de útero. Já em relação às pré-disposições clínicas, a média de idade das mulheres afetadas por lesões metaplásicas e displásicas encontrava-se entre a 3^a. e 4^a. décadas de vida, enquanto nas pacientes com lesões malignas em colo de útero a média de idade estava localizada entre a 4^a. e 5^a. décadas de vida.

Em relação ao tabagismo, o presente estudo não mostrou relação direta entre o uso de cigarro, gravidade e evolução das lesões. Tais dados também foram encontrados por Campaner et al (2007). O autor relata não haver influência do tabagismo na migração de células de defesa do tipo Langerhans (CLs) para tecidos com lesões intraepiteliais escamosas de alto grau. No entanto, segundo Cerqueira et al (1998), devido às alterações gênicas que causa, o tabagismo está fortemente relacionado às alterações celulares em colo uterino e representa um risco para a progressão das lesões. Ademais, sabe-se que mulheres fumantes apresentam menor quantificação de CLs em epitélio normal em relação a mulheres não fumantes, o que compromete o sistema imune local (POPPE et al., 1996; BYKOV, 1997; NADAIS et al., 2006; CAMPANER, NADAIS e GALVÃO, 2009).

Não foi detectada relação estatística entre a gravidade das lesões e as doenças de base analisada. Entretanto, apesar de não termos encontrado relação estatística entre pacientes portadoras de HIV e pacientes sem HIV e a gravidade das lesões de colo de útero, sabe-se que alterações causadas pela presença do vírus, presente em quatro casos (6,45%), podem resultar na diminuição das células imunocompetentes no cervix. Tal condição também já foi descrita em outras regiões anatômicas como linfonodos e mucosa oral de pacientes em estágio avançado de AIDS (JIMENEZ et al., 2006; GONDAK et al, 2012).

A presença das infecções oportunistas sugere um microambiente mais permissivo a transformações malignas e à permanência das infecções virais devido ao efeito imunossupressivo que ocorre pela baixa densidade e baixa capacidade funcional de células do sistema imune local (CONNOR, 1999; JIMENEZ, 2006; APPLE, 1994; NADAIS, 1994; OLAITAN, 1996). Gonçalves et al (2004) notaram persistência de infecção por HPV em colo de útero de mulheres portadoras de AIDS. Os autores afirmaram que alguns tipos de HPV e

de infecção por HIV estão provavelmente associados a alterações na função imune local do colo uterino, tornando-o mais favorável à permanência de lesões intraepiteliais escamosas de colo de útero. Contraditoriamente, Levi et al (2005) relatou que lesões displásicas de alto grau resultantes da infecção por HPV podem estar associadas com uma melhora da resposta imune local. Para Dutra (2010), os genes do sistema HLA localizados no braço curto do cromossomo 6 podem interferir na regulação da resposta dos linfócitos T a agentes exógenos, como o vírus HPV. Encontrou-se associação entre carcinoma epidermóide e alguns alelos do gene HLA, e alguns estudos sugerem que HLA classe II pode estar associado à susceptibilidade a infecções por HPV, sendo que determinados haplótipos são menos aptos a eliminar a infecção pelo vírus.

Ikeda et al (2008) realizou imunomarcagem de citoqueratinas do tipo CK8, CK17 e proteína p16 em lesões intraepiteliais escamosas de colo de útero e carcinomas de colo uterino. O estudo apontou que a imunomarcagem das moléculas varia de acordo com o grau das lesões, sendo que o aumento da expressão dessas moléculas esteve significativamente relacionada com a progressão do grau das lesões. (FUKUDA et al., 1993) demonstraram significante redução de células Langerhans (CLs) S-100+ e células T helper em lesões displásicas persistentes, mantendo, neste tipo de lesão, uma baixa resposta imune local.

Na corrente pesquisa, relatamos uma correlação positiva entre a contagem de células HLADR+ no epitélio e no tecido conjuntivo de todas as lesões estudadas. Esse fenômeno pode ser explicado pela sequência migratória das APCs, já que o reconhecimento do antígeno é efetuado no epitélio e então as células migram em direção aos linfonodos, passando pelo tecido conjuntivo. Dessa maneira, a quantidade de células expressa imuno-histoquimicamente no conjuntivo depende diretamente da quantidade de células de defesa recrutadas no epitélio.

Na nossa pesquisa, constatamos uma contagem de células de defesa em lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL)(grupo 2) mais expressiva em relação a lesões de alto grau (HSIL). Giannini et al (2002) mostrou que em lesões displásicas do colo uterino, a quantificação de CLs aumentou e a sua atividade funcional diminuiu em relação ao tecido normal da zona de transformação (ZT), que é a região anatômica do colo uterino onde a maioria das lesões intraepiteliais escamosas se inicia. Isso sugere que pacientes portadoras de lesões menos agressivas, as células de vigilância do sistema imune local são

recrutadas fazendo com que o número de células imunomarcadas esteja aumentado (ABDOU et al., 1999).

O mecanismo de recrutamento de células apresentadoras de antígenos pode estar vinculado à liberação de moléculas pró-inflamatórias presentes nessas lesões, como quimiocinas e citocinas, ativando a defesa local por meio do recrutamento de CDs (SHEY et al., 2016). É provável que isso esteja vinculado à contenção da progressão da doença, ajudando no combate às alterações celulares e teciduais. Já nos casos de carcinoma pouco diferenciado (grupo 6), em que se manifesta a forma mais grave de carcinoma, a quantificação de células HLA-DR+ tanto epiteliais quanto conjuntivas não foi detectada. Nas lesões mais invasivas, como carcinomas e adenocarcinomas, a contagem das células de defesa HLA-DR+ diminui, o que está possivelmente ligado ao decréscimo da proteção imune local, deixando os tecidos mais susceptíveis à progressão da doença (LAZARIS, 2004; ZHOU, 2006; TAKEHARA, 1996). Além disso, acreditamos que o impacto das células neoplásicas e sua capacidade de metástase pode estar vinculada à diminuição das células de defesa no local devido à liberação de mediadores químicos específicos, favorecendo a evasão imune das células alteradas e permanência dessas lesões.

Abdou et al (1999), pesquisando CLs em lesões displásicas e neoplásicas de colo uterino, encontrou um aumento na proliferação e no número de CLs em lesões intraepiteliais escamosas como uma resposta imune, sendo esta suprimida pelo carcinoma invasivo. O autor não encontrou relação direta entre o número de LCs e o grau do carcinoma. Entretanto, em nosso estudo, evidenciou-se uma tendência na diminuição das APCs em lesões mais agressivas correspondentes ao carcinoma de células escamosas pouco diferenciado e os adenocarcinomas (grupos 6 e 7).

Com relação às limitações para a execução do presente estudo, o inadequado preenchimento de alguns prontuários prejudicou a completa coleta dos dados clínicos, assim como o encaminhamento de algumas pacientes para outros serviços de saúde também impediram uma melhor exploração das informações referentes ao tratamento, evolução e sobrevida.

Devido à similaridade histológica entre a mucosa uterina e a mucosa oral, pretendemos usá-la como referência para futuros estudos com lesões em cavidade oral, já que ambas sofrem a mesma influência de fatores de risco e agentes externos como HPV, doenças oportunistas e tabagismo (ZONTA et al., 2012; HE et al., 2013; VINOTHKUMAR et al., 2016). Dessa maneira, o maior entendimento entre a relação das

APCs no desenvolvimento do câncer poderá contribuir no diagnóstico precoce e na elaboração de novas terapias antineoplásicas.

6. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos na presente pesquisa concluímos:

- Há uma relação positiva na população de células HLA-DR+ tanto no tecido epitelial quanto conjuntivo em pacientes portadoras de lesões displásicas e neoplásicas em colo de útero;

- Pacientes com lesões neoplásicas histologicamente mais agressivas como carcinomas de células escamosas pouco diferenciados ou adenocarcinomas em colo de útero apresentam menor população de células APCs locais do que pacientes portadoras de lesões displásicas ou carcinomas mais diferenciados;

- Doenças de base ou fatores de risco como tabagismo, alcoolismo e terapias hormonais não foram relacionados com a quantificação de células HLA-DR+ em colo de útero;

- Mais estudos são necessários para estabelecer a correlação entre o HPV e a população de APCs no desenvolvimentos de lesões malignas e potencialmente cancerizáveis e colo de útero.

Referências

ABDOU, L,A et al. Immunohistochemical and ultrastructural study of Langerhans's cells in squamous cell carcinoma of the cervix. *J Obstet Gynaecol Res*, v. 25, n. 1, pg. 15-21. Feb,1999.

AL-SALEH, W. et al. Correlation of T-helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J. Pathol*, v. 184, n. 3, pg. 283-90, Mar, 1998.

AMBE, K; MORI, M; ENJOJI, M. S-100 protein-positive dendritic cells in colorectal adenocarcinomas. Distribution and relation to the clinical prognosis. *Cancer*, v. 63, n. 3, pg. 496-503, Feb 1989.

AMBROS, R. A; KURMAN, R. J. Current concepts in the relationship of human papillomavirus infection to the pathogenesis and classification of precancerous squamous lesions of the uterine cervix. *Semin. Diagn. Pathol*, v. 7, n. 3, pg. 158-72, Aug, 1990.

APPLE, RJ. et al. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nat Genet*, v. 6, n. 2, pg. 157-62. Feb, 1994.

BECKER, Y. Anticancer role of dendritic cells (DC) in human and experimental cancers--a review. *Anticancer Res.*, v. 12, n. 2, pg. 511-20, Mar-Apr, 1992.

BECKER, Y. Dendritic cell activity against primary tumors: an overview. *In vivo*, v. 7, n. 3, pg. 187-91, May-Jun, 1993.

BERGEFELT, L. et al. Density and morphology of Langerhans cells in basal cell carcinomas of the face and trunk. *Br. J. Dermatol*, v. 127, n. 6, pg. 575-9, Dec, 1992.

BERGFELT, L. et al. Quantitative and 3-dimensional analysis of Langerhans cells in basal cell carcinoma. A comparative study using light microscopy and confocal laser scanning microscopy. *Br. J. Dermatol.*, v. 130, n. 3, pg. 273-80, Mar, 1994.

BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol*, v. 55, n. 4, pg. 244-65, Apr 2002.

BYKOV, VI. [The functional morphology of the Langerhans cells in the female reproductive tract]. *Morfologia*, v. 111, n. 2, pg. 7-16, 1997.

CALORE, E. E. et al. Expression of Ki-67 in cervical epithelial cells in preneoplastic lesions of patients with AIDS. *Gynecol Obstet Invest*, v. 51, n. 1, pg. 51-4, 2001.

CAMPANER, A. B. et al. Evaluation of density of Langerhans cells in human cervical intraepithelial neoplasia. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2007.

CAMPANER, A. B; NADAIS, Rf; GALVÃO, Ma. The effect of cigarette smoking on cervical langerhans cells and T and B lymphocytes in normal uterine cervix epithelium. *Int J Gynecol Pathol*, v. 28, n. 6, pg. 549-53. Nov, 2009.

CANNISTRA, S. A; NILOF, J. M. Cancer of the uterine cervix. *N Engl J Med*, v. 334, n. 16, pg. 1030-8, Apr 1996.

CERQUEIRA, EM; SANTORO, CM; FREITAS, BA. Genetic damage in exfoliated cells of the uterine cervix Association and interaction between cigarette smoking and progression to malignant transformation? *Acta Cytol*, v. 42, n. 3, pg. 639-49. May-Jun, 1998.

CHARBONIER, A. S. et al. Macrophage inflammatory protein 3alpha is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. *J Exp Med*, v. 190, n. 12, pg. 1755-68, Dec 1999.

COLEMAN, N; STANLEY, Ma. Analysis of HLA-DR expression on keratinocytes

CONNOR, J. et al. Evaluation of Langerhans' Cells in the Cervical Epithelium of Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Gynecol Oncol*, v. 75, n. 1, pg. 130-5. Oct, 1999.

CRUM, C. P. Symposium part 1: Should the Bethesda System terminology be used in diagnostic surgical pathology?: Point. *Int J Gyneco Pathol*, v. 22, n. 1, pg. 5-12, Jan 2003.

DURAY, A. et al. Immune Suppression in Head and Neck Cancers: A Review. *Clin Dev Immunol*. 2010.

DUTRA, I, C, F. Aspectos Moleculares do Cancro do Colo do Útero - Variantes genéticas como factores de risco[dissertação]. Lisboa: Universidade de Lisboa, Faculdade de ciências, Departamento de Biologia Vegetal; 2010.

FERENCZY, A; FRANCO, E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol*, v. 3, n. 1, pg. 11-6, Jan 2002.

FUKUDA, K. et al. Local immune response in persistent cervical dysplasia. *Obstet Gynecol*, v. 82, n. 6, pg. 941-5. Dec, 1993.

GARG, N, K. et al. RNA pulsed dendritic cells: an approach for cancer immunotherapy. *Vaccine*, v. 31, n. 8, pg. 1141-56, Feb 2013.

GIANNINI, SL. et al. Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Int J Cancer*, v. 97, n. 5, pg. 654-9. Feb, 2002.

GONÇALVES, MA. et al. Langerhans' cell count and HLA class II profile in cervical intraepithelial neoplasia in the presence or absence of HIV infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, v. 114, n. 2, pg. 221-7. Jun, 2004.

GONDAK, Rogério et al. Depletion of Langerhans cells in the tongue from patients with advanced-stage acquired immune deficiency syndrome: relation to opportunistic infections. *Histopathology*, v. 60, n. 3. Feb, 2012.

GROUP, I. W, Human papillomaviruses. IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France: International Agency of Research on cancer., 1995.

HE, Y. F. et al. [Risk of cervical cancer and precancerous diseases in the oral HPV carriers]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. v. 48, n. 8, pg. 611-6. Aug, 2013.

IARC. Human papillomaviruses. IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France: International Agency of Research on cancer., 1995.

IEDKA, K. et al. Coordinate expression of cytokeratin 8 and cytokeratin 17 immunohistochemical staining in cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma: an immunohistochemical analysis and review of the literature. *Gynecol. Oncol*, v. 108, n. 3, pg. 598-602. Mar, 2008.

IMAI, Y; YAMAKAWA, M. Dendritic cells in esophageal cancer and lymph node tissues. *In vivo*, v. 7, n. 3, pg. 239-48, May-Jun 1993.
in cervical neoplasia. *Int J Cancer*, v. 56, n. 3, pg. 314-9. Feb, 1994.

JIMENEZ, F. et al. High-risk human papilloma virus infection decreases the frequency of dendritic Langerhans' cells in the human female genital tract. *Immunology*, v. 117, n. 2, pg. 220-8. Feb, 2006.

KELLER, R. Dendritic cells: their significance in health and disease. *Immunol Lett*, v. 78, n. 3, p. 113-22, Oct 2001.

KOSTEN, I.J. et al. Comparative phenotypic and functional analysis of migratory dendritic cell subsets from human oral mucosa and skin. *PLoS One*, v 12, n. 7, Jul, .2017.

LAZARIS, A. et al. Tissue evaluation of immune markers in endometrial and cervical carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res*, v. 23, n. 2, pg. 269-75. Jun, 2004.

LEVI, G. et al. Relationship between HIV viral load and Langerhans cells of the cervical epithelium. *J Obstet Gynaecol Res*, v.31, n. 2, pg. 178-84. Apr, 2005.

LI, C. et al. The immune function differences and high-risk human papillomavirus infection in the progress of cervical cancer. *Eur J Gynaecol Oncol.*, v. 35, n. 5, pg. 557-61. 2014.

LUZARDO-BAPTISTA, MJ; LUZARDO, JR. [Mucose associated lymphoid tissue. Antigen presenting cells]. *Invest Clin.*, v. 54, n. 4, pg. 417-26. Dec, 2013.

LUZARDO-BATISTA, MJ¹; LUZARDO, JR². [Mucose associated lymphoid tissue. Antigen presenting cells]. *Invest Clin*, v. 54, n. 4, pg. 417-26. Dec, 2013.

MA, C, X. et al. Langerhans cells in nasopharyngeal carcinoma in relation to prognosis. *In vivo*, v. 9, n. 3, pg. 225-9. May, 1999.

MARDONES, F. et al. [CD1a+ Langerhans cells in the peritumoral epidermis of basal cell carcinoma]. *Actas Dermosifiliogr*, v. 100, n. 8, p. 700-5, Oct 2009.

NADAIS, F. et al. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nat Genet*, v. 6, n. 2, pg. 157-62. Feb, 1994.

NADAIS, F. et al. Langerhans' cells and smoking in intraepithelial neoplasia of the cervix. *Gynecol Oncol*, v. 102, n. 2, pg. 356-60, Aug, 2006.

NOMORI, H. et al. Histiocytes in nasopharyngeal carcinoma in relation to prognosis. *Cancer*, v. 57, n. 1, p. 100-5, Jan 1986.

OLAITAN, A. et al. The distribution of immunocompetent cells in the genital tract of HIV-positive women. *AIDS*, v. 10, n. 7, pg. 759-64, Jun, 1996.

OYAMA, T. et al. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol*, v. 160, n. 3, p. 1224-32, Feb 1998

PEREZ, L. et al. Comparative analysis of CD1a, S-100, CD83, and CD11c human dendritic cells in normal, premalignant, and malignant tissues. *Histol Histopathol*, v. 20, n. 4, p. 1165-72, Oct 2005.

PIRTSKHALAISHVILI, G. et al. Cytokine-mediated protection of human dendritic cells from prostate cancer-induced apoptosis is regulated by the Bcl-2 family of proteins. *Br J Cancer*, v. 83, n. 4, p. 506-13, Aug 2000. ISSN 0007-0920

PIRTSKHALAISHVILLI, G. et al. Cytokine-mediated protection of human dendritic cells from prostate cancer-induced apoptosis is regulated by the Bcl-2 family of proteins. *Br J Cancer*, v. 83, n. 4, p. 506-13, Aug 2000

PIVER, M. S. Invasive cervical cancer in the 1990s. *Semin Surg Oncol*, v. 6, n. 6, p. 359-63, 1990.

PLZÁKOVÁ, Z. et al. Comparison of the expression of Langerin and 175 kD mannose receptor in antigen-presenting cells in normal human skin and basal cell carcinoma. *Folia Biol (Praha)*, v. 50, n. 2, p. 71-3, 2004.

POPPE, W. A. et al. Langerhans' cells and L1 antigen expression in normal and abnormal squamous epithelium of the cervical transformation zone. *Gynecol Obstet Invest*, v. 41, n. 3, pg. 207-13, 1996.

POPPE, W; DRIJKONINGEN, M; IDE, PS. Langerhans' cells and L1 antigen

SCHREINER, T. U. et al. SCHAUMBURG-LEVER, G. Langerhans' cells in skin tumors. *Arch Dermatol*, v. 131, n. 2, p. 187-90, Feb 1995.

SHEY, M. et al. Modulation of Female Genital Tract-Derived Dendritic Cell Migration and Activation in Response to Inflammatory Cytokines and Toll-Like Receptor Agonists. *PLoS ONE*, v. 11, n. 5. May, 2016.

SHURIN, M. R. et al. Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic cell function by tumor-derived IL-10. *Int J Cancer*, v. 101, n. 1, p. 61-8, Sep 2002.

TAKEHARA, K. [Local immune responses in uterine cervical carcinogenesis]. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, v. 48, n. 11, pg. 1063-70. Nov, 1996.

TAMIOLAKIS, D. et al. Prognostic significance of HLA-DR antigen in dysplasia, carcinoma in situ and invasive carcinoma of the gallbladder. *East Afr Med J*. v. 80, n. 11, pg. 554-8. Nov, 2003.

THIVOLET, J. et al. Cell-mediated immunity in wart infection. *Int J Dermatol*, v. 21, n. 2, p. 94-8, Mar 1982.

TSUJITANI, S. et al. Infiltration of dendritic cells in relation to tumor invasion and lymph node metastasis in human gastric cancer. *Cancer*, v. 66, n. 9, p. 2012-6, Nov 1990.

VINOTHKUMAR, V. et al. TERT promoter hot spot mutations are frequent in Indian cervical and oral squamous cell carcinomas. *Tumour Biol.*, v. 37, n. 6, pg. 7907-13. Jun, 2016.

WALBOOMERS, J. M. et al.. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, v. 189, n. 1, p. 12-9, Sep 1999.

WHO, WHO Classification of Tumours of the Female Reproductive Organs. 4th. Lyon: IARC, 2014. ISBN 9789283224358.

YANG, D. et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*, v. 286, n. 5439, p. 525-8, Oct 1999.

ZHANG, SR. [Langerhans cells in laryngeal carcinoma in relation to prognosis]. *Zhonghua er bi yan hou ke za zhi*, v. 27, n. 5, pg. 297-8,319. Jan, 1992.

ZHOU, J. H. et al. Altered expression of cellular membrane molecules of HLA-DR, HLA-G and CD99 in cervical intraepithelial neoplasias and invasive squamous cell carcinoma. *Life Sci.*, v. 78, n. 22, pg. 2643-9. April, 2006.

ZONTA, M. A. et al. Infecção oral pelo HPV em mulheres com lesão escamosa de colo uterino no sistema prisional da cidade de São Paulo, Brasil. *Braz. j. otorhinolaryngol*, v. 78, n.2, Mar/Apr, 2012.

APÊNDICE A – APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CD1a+ e CD83+ EM LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS DO COLO DE ÚTERO

Pesquisador: Rogério de Oliveira Gondak

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 56663316.0.0000.0121

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.748.465

Apresentação do Projeto:

Trata-se do projeto de pesquisa de Rogério de Oliveira Gondak junto ao Departamento de Patologia/UFSC. O objetivo deste projeto, de caráter prospectivo, será avaliar quantitativamente a população de células dendríticas (CDs) em amostras de biópsias ou peças cirúrgicas de colo de útero oriundas de cinco grupos distintos de pacientes: portadoras de diagnóstico de cervicites com metaplasia (Grupo 1, n=10), NIC I em colo de útero (Grupo 2, n=10), portadoras de NIC II/III (Grupo 3, n=10), carcinomas bem diferenciados em colo de útero (Grupo 4, n=10), carcinomas moderadamente diferenciados em colo de útero (Grupo 5, n=10), carcinomas pouco diferenciados em colo de útero (Grupo 6, n=10) e adenocarcinomas (Grupo 7, n=10). Lâminas histológicas coradas em hematoxilina & eosina (H&E) serão utilizadas para classificação das

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.748.465

lesões displásicas e tumorais e, reações imuno-histoquímicas, com os anticorpos anti-CD1a e anti-CD83, serão aplicadas para a identificação das CDs. Os marcadores imunoistoquímicos serão quantificados com o auxílio de ocular reticulada em alta magnificação (400x). Para a análise estatística serão aplicados testes paramétricos e não-paramétricos com o software SPSS versão 18.0. Os resultados serão expressos como média \pm DP e o nível de significância estatística considerado será de 5% ($P < 0.05$). Para a seleção dos indivíduos participantes da pesquisa, 70 no total, serão incluídas amostras teciduais de colo de útero de mulheres, com idades pretendidas entre 18 e 60 anos. Haverá coleta de dados em fichas de biópsias/peças cirúrgicas e dos prontuários médicos.

Objetivo da Pesquisa:**Objetivo Primário:**

O presente estudo pretende avaliar quantitativamente a população de CDs em cinco grupos distintos de pacientes: pacientes portadoras de diagnóstico de cervicite com metaplasia (Grupo 1), NIC I em colo de útero (Grupo 2), portadoras de NIC II/III (Grupo 3), carcinomas bem diferenciados em colo de útero (Grupo 4), carcinomas moderadamente diferenciados em colo de útero (Grupo 5), carcinomas pouco diferenciados em colo de útero (Grupo 6) e adenocarcinomas (Grupo 7).

Objetivo Secundário:

- a-) Classificar as lesões displásicas e tumorais de acordo com os critérios da OMS;
- b-) Identificar e quantificar, por meio de reações imunohistoquímicas, as CDs imaturas e maduras imunomarcadas respectivamente pelos anticorpos CD1a e CD83 em lesões metaplásicas, displásicas e tumorais de colo de útero;
- c-) Comparar o número médio de CDs em áreas intra e peritumorais nos grupos afetados por carcinomas e

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.748.465

adenocarcinomas;

d-) Descrever as alterações morfológicas apresentadas pelas CDs sob influência das displasias teciduais ou neoplasias;

e-) Correlacionar os achados clínicos dos pacientes como idade, etnia, uso crônico de medicamentos, doenças de base, tabagismo e nível socioeconômico com os achados microscópicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos:**

Embora os procedimentos de biópsia ou intervenções cirúrgicas em colo de útero são muito seguros, há um pequeno risco de sangramento ou infecção local. Caso isto ocorra, você poderá ter febre, dor, "inchaço" (edema), rubor ou sangramento na área cirúrgica. Além disso, o outro desconforto ou risco possível é a perda de sigilo das suas informações pessoais. Ressalto que sua identidade, bem como todos os dados ou informações coletadas serão consideradas confidenciais, mantidas em sigilo e armazenadas no computador do pesquisador responsável com acesso restrito.

Benefícios:

Não há benefícios diretos para os sujeitos participantes desta pesquisa. Os benefícios esperados estão relacionados ao melhor entendimento do papel das células dendríticas no desenvolvimento do câncer de colo de útero.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

-

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos apresentados.

Recomendações:

-

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC**



Continuação do Parecer: 1.748.465

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

-

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_701412.pdf	12/09/2016 10:33:19		Aceito
Outros	Carta_respostall.pdf	12/09/2016 10:32:30	Rogério de Oliveira Gondak	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ProjetoII.pdf	12/09/2016 10:31:24	Rogério de Oliveira Gondak	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_modificadoII.pdf	12/09/2016 10:29:20	Rogério de Oliveira Gondak	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_instituicao.jpg	01/06/2016 17:20:50	Rogério de Oliveira Gondak	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rostofinal.pdf	23/05/2016 11:15:50	Rogério de Oliveira Gondak	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 27 de Setembro de 2016

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

ANEXO A – ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA

ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 20 dias do mês de outubro de 2017, às 10.15 horas,
em sessão pública no (a) CCS desta Universidade, na presença da

Banca Examinadora presidida pelo Professor

Rogério de Oliveira Gondak

e pelos examinadores:

- 1 - Prof. Rodolfo Otávio Alves de Lima
- 2 - Dr. Maurício Comparatto Minamirato

o aluno Natalia Cristina Trentin Bordignon

apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação intitulado:

Exposição de células HLA-DR positivas em
lesões metaplásicas, displásicas e neoplásicas de colú de
efeito

como requisito curricular indispensável à aprovação na Disciplina de Defesa do TCC e a integralização do Curso de Graduação em Odontologia. A Banca Examinadora, após reunião em sessão reservada, deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido Trabalho de Conclusão do Curso, divulgando o resultado formalmente ao aluno e aos demais presentes, e eu, na qualidade de presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo aluno orientando.

[Assinatura]
Presidente da Banca Examinadora

[Assinatura]
Examinador 1

[Assinatura]
Examinador 2

Natalia C. Trentin Bordignon
Aluno